

К. В. КУДИН, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ

ПРОДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО УКРОЧЕННОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ ТИПА 2 В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Цирковирс свиной типа 2 является экономически важным патогеном, причиняющим огромные убытки свиноводству по всему миру, поэтому разработка средств диагностики и профилактики цирковирозов стала приоритетным направлением в области ветеринарии, занимающейся борьбой с опасными патогенами животных. Ранее мы разработали несколько конструкций для экспрессии различных вариантов рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 и остановились на одной из них для подробного изучения различных аспектов продукции и накопления рекомбинантного белка в клетках штамма *E. coli*. В данной статье представлены результаты ряда работ: опытов сравнительной экспрессии укороченного белка капсида и бычьего α -интерферона; изучения условий, влияющих на продукцию белка; исследования накопления рекомбинантного белка капсида в клетках продуцента в различных автоиндукционных средах.

Ключевые слова: ЦВС-2; рекомбинантный белок; белок капсида; экспрессия; автоиндукция; биореактор.

Porcine circovirus type 2 is an economically important pathogen, causing great losses to pig-producing industry worldwide, that's why development of diagnostic and prophylactic tools became a priority course at the field of veterinary science concerning struggle against dangerous livestock pathogens. Previously we developed several constructions for expression of different variants of recombinant PCV2 capsid protein and chose one for detailed investigation of different aspects of production and accumulation of the protein in the *E. coli* strain cells. At this research work the results of comparative expression experiments of the truncated capsid protein and cow α -interferon are presented, conditions affecting capsid protein production are studied, and recombinant protein accumulation in autoinduction media is investigated.

Key words: PCV2; recombinant protein; capsid protein; expression; autoinduction; bioreactor.

Цирковир свиней типа 2 (ЦВС-2) – основной возбудитель ряда заболеваний, объединенных в англоязычной литературе под общим названием Porcine Circovirus-Associated Disease (PCVAD) – заболевания, связанные с цирковирусом свиней [1, 2]. Несмотря на простоту организации вируса и его небольшой размер [3, 4], ЦВС-2 приносит огромные убытки в индустрии свиноводства по всему миру и потому стоит в ряду важнейших экономических угроз животноводству [5]. Долгое время борьба с распространением инфекции продолжается с переменным успехом, однако не всегда принимаемые меры оказываются эффективными [6, 7]. Профилактика и своевременное выявление инфекции являются наиболее действенным способом предотвращения распространения цирковириозов, поэтому разработка вакцин и методов диагностики стала приоритетным направлением исследований в области ветеринарии, занимающейся борьбой с опасными патогенами животных [5, 8].

Ранее мы сконструировали несколько открытых рамок трансляции, кодирующих различные варианты белка капсида ЦВС-2, и обосновали причины, по которым укороченный вариант белка представляется нам наиболее удобной мишенью для экспрессии в штамме *E. coli* [9]. Однако многие аспекты продукции и накопления белка капсида в клетках продуцента не рассматривались, поэтому целью данного исследования стало изучение процесса биосинтеза рекомбинантного укороченного белка капсида ЦВС-2 в клетках штамма *E. coli*, а также выявление условий культивирования и факторов роста, способных увеличить эффективность его наработки.

Материалы и методика исследования

Бактериальные штаммы, плазмиды и праймеры

Бактерии штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]) фирмы Stratagene использовали для продукции рекомбинантных белков.

Конструкция для экспрессии открытой рамки трансляции, кодирующей укороченный белок капсида ЦВС-2 в составе вектора pET-24b (Novagen), описывалась ранее [9], за тем лишь исключением, что стоп-кодон рамки трансляции белка капсида был удален, в результате чего в него была включена гистидиновая метка из полилинкера вектора. Для сравнительного опыта экспрессии использовали аналогичную конструкцию с геном бычьего α -интерферона (ИФН- α), любезно предоставленную М. И. Потаповичем [10].

Генно-инженерные методики и ферменты

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ), подготовку проб, фиксацию и окрашивание ПААГ, исследование растворимости рекомбинантного белка проводили в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [11]. Скорость роста культуры определяли по ее мутности (рассеиванию света) при длине волны 600 нм (ОП₆₀₀), разведение образцов подбиралось таким образом, чтобы результат измерения не превышал 0,4. Перед электрофорезом белков каждая проба нормализовалась по оптической плотности. Опыты по продукции рекомбинантных белков в небольших объемах проводили по стандартному протоколу (с использованием ИПТГ) в соответствии с инструкцией производителя штамма-продуцента либо по методу автоиндукции [12]. Для изучения особенностей накопления укороченного белка капсида в условиях автоиндукции использовали 15-литровый биореактор фирмы Biotechno (Корея) с программным обеспечением C-BIO D (Франция). Культуру продуцента растили в среде стандартного состава ZYM-5052, ZYM-20052 (в некоторых экспериментах в ZYM-20052 добавляли сукцинат натрия до концентрации 25 мМ) [12] в объеме 7,5 л, уровень растворенного кислорода поддерживали выше 30 % от первоначального значения (до засева инокулята) путем регулирования интенсивности перемешивания, скорости воздушного потока, продуваемого через барботер, или давления в колбе ферментера (до 2 бар). Инокулят растили в среде ZYM-505 [12] до поздней экспоненциальной фазы и засевали в объеме 5 % от объема среды в ферментере.

Денситометрический анализ изображений окрашенных полиакриламидных гелей производился с помощью пакета программ ImageJ 1.46r (National Institute of Health, США) [13].

Результаты исследования и их обсуждение

В нашей предыдущей работе [9] рутинные опыты по продукции гетерологичных белков проводили с использованием метода автоиндукции, предложенного Стюдиером [12], что намного упрощало работу с некоторыми трудноэкспрессируемыми вариантами последовательностей капсидного белка, повы-

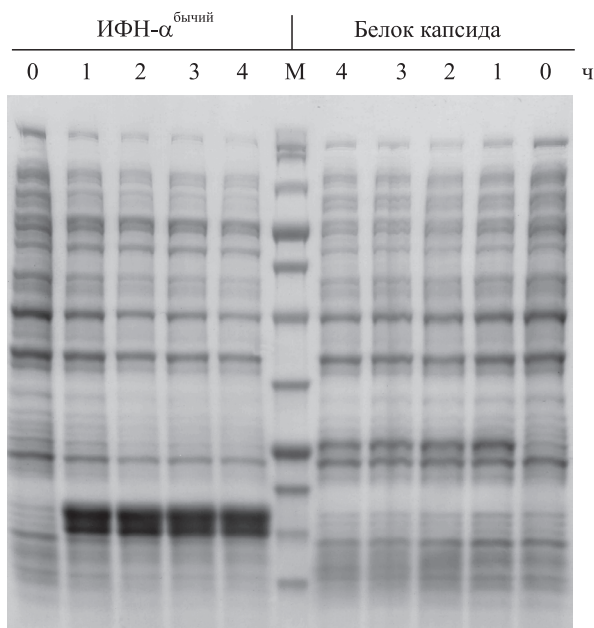


Рис. 1. Индукция экспрессии рекомбинантных белков в среде LB с помощью ИПТГ (0,5 мМ). Над дорожками указано время отбора соответствующих проб, ч, с момента добавления индуктора (0 ч)

шало сходимость результатов, а также в значительной мере автоматизировало процесс, поскольку не требовало постоянного участия исследователя. Однако для изучения особенностей биосинтеза и накопления укороченного белка капсида в клетках продуцента использовали стандартный протокол индукции, так как он позволяет в большей мере контролировать процесс экспрессии, а интенсивность продукции данного варианта белка капсида достаточна для такого эксперимента. В качестве опыта сравнения использовали идентичную систему экспрессии бычьего α -интерферона, который, как было показано ранее, в условиях эксперимента эффективно продуцируется и накапливается в клетках в виде телец включения [10] в отличие от укороченного белка капсида, который сохраняется в растворимой форме. Стационарная ночная культура каждого штамма в среде LB разводилась этой же средой в 20 раз и наращивалась до $ОП_{600}=1$, затем к культуре добавлялся индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ, измерение оптической плотности и отбор проб производили каждый час. Результаты данного эксперимента представлены на рис. 1.

Как можно видеть, основная масса рекомбинантных белков накапливается в клетках очень быстро и в дальнейшем происходит лишь увеличение биомассы

культуры (рис. 2, а) без сопутствующего повышения доли белка в клетках. Денситометрический анализ изображения окрашенного геля показал, что доля белка капсида в клетках достигает максимума уже в первый час экспрессии (12–15 % от общего белка) и остается на этом уровне длительное время (4–6 ч), иногда снижаясь на 1–2 % к концу эксперимента, тогда как доля ИФН- α в первый час биосинтеза составляет лишь 39 %, достигая максимума ко второму часу (53–55 % от общего белка).

Такое различие в динамике накопления данных белков визуально заметить сложно, однако оно легко объясняется, если взглянуть на рис. 2, где виден вполне ожидаемый результат – в первый час после начала образования гетерологичного белка скорость роста индуцированных культур замедляется по сравнению с контрольной неиндуцированной культурой (см. рис. 2, а). Если это замедление выразить в показателях специфической скорости роста (μ), рассчитываемых при отборе каждой пробы, начиная с момента индукции, и нормализовать их по отношению к аналогичным показателям контрольной культуры, становится очевидной разница в замедлении скорости роста двух продуцентов (рис. 2, б).

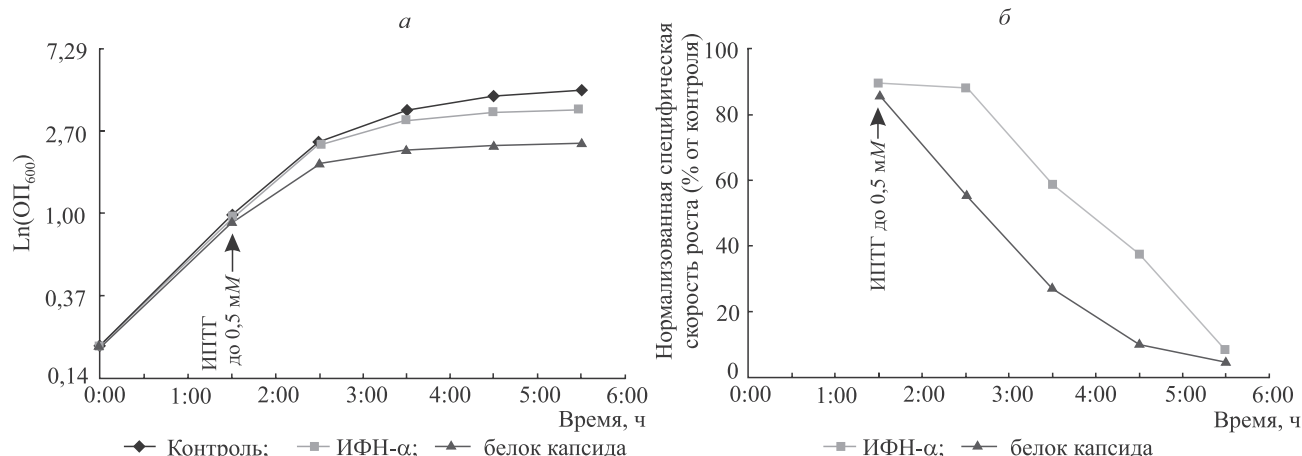


Рис. 2. Сравнение кривых роста культур продуцентов бычьего ИФН- α и укороченного белка капсида ЦВС-2.

Момент индукции обозначен стрелкой:

а – кривая роста биомассы продуцентов при экспрессии в полулогарифмических координатах. Контролем является неиндуцированная культура продуцента; б – изменение показателя специфической скорости роста продуцентов ИФН- α и белка капсида, выраженное в процентах от аналогичного показателя контрольной неиндуцированной культуры.

◆ Контроль; ■ ИФН- α ; ▲ белок капсида

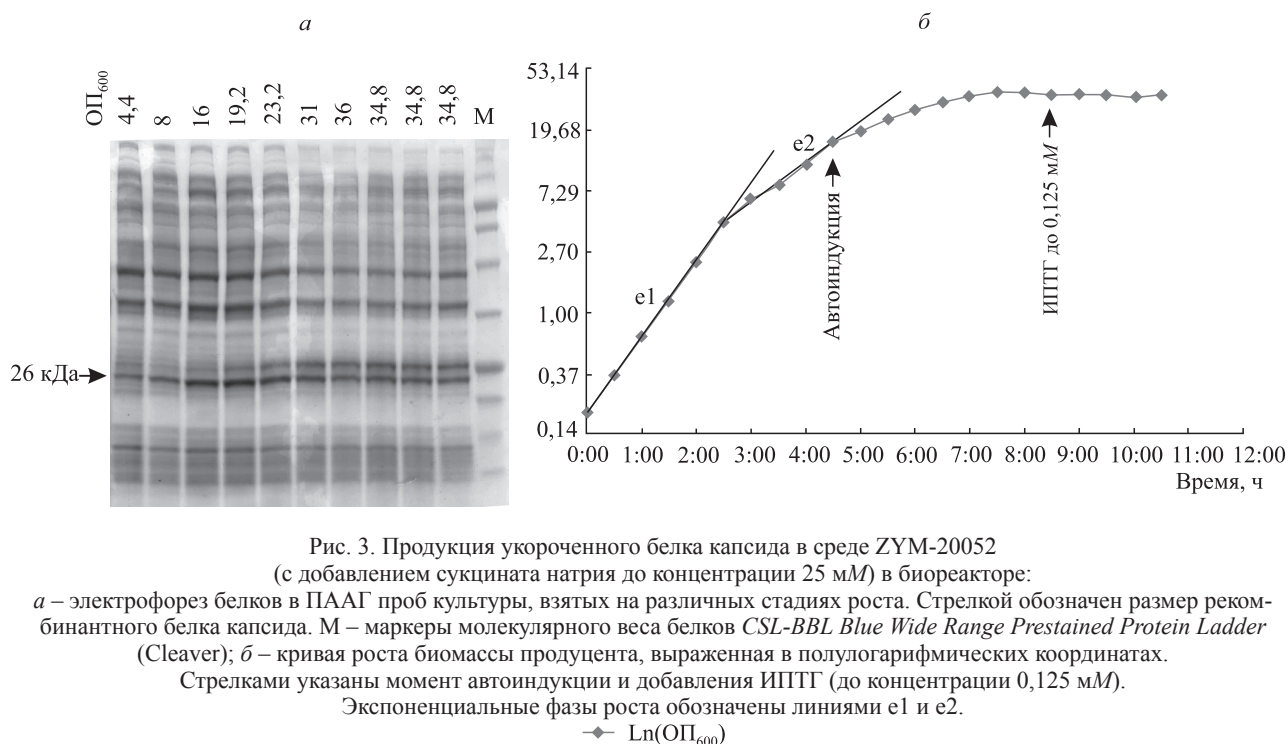
Первоначально после разведения все культуры растут с одинаковой скоростью, достигая плотности 0,95–0,97 (ОП₆₀₀) к моменту индукции. После добавления индуктора скорость роста культуры продуцента белка капсида начинает резко и линейно уменьшаться в течение 2 ч, затем скорость замедления плавно снижается, приближаясь к нулю, – достигается равновесная точка стационарной индуцированной культуры. Кривая роста биомассы продуцента интерферона больше напоминает кривую роста неиндуцированной культуры, в первый час после индукции экспрессии скорость роста культуры падает лишь незначительно. Фактически в данный период времени процессы роста культуры и продукции белка идут параллельно и ресурсы клетки, которые пока еще быстро возобновляются из среды, равномерно распределяются между ними или, по крайней мере, их с избытком хватает на оба процесса. Поэтому активно делящиеся клетки не успевают достигнуть точки насыщения рекомбинантным белком. Начиная со 2-го часа и до конца эксперимента скорость синтеза интерферона начинает преобладать над скоростью роста биомассы, которая уменьшается линейно. Массовая доля рекомбинантного интерферона достигает максимального значения (53–55 %) и далее сохраняется на этом уровне.

Синтез белка в бактериальных клетках, несомненно, является ресурсозатратным процессом, особенно если речь идет о продукции чужеродных белков штаммами-продуцентами, природа которых искусственно направлена на повышение приоритета данного процесса перед остальными функциями клетки. Поэтому можно обоснованно ожидать, что начало синтеза гетерологичного белка в клетках продуцента повлияет на показатель скорости роста культуры, который, являясь совокупным результатом множества физиологических процессов, способен отражать происходящие в клетках изменения, такие как перераспределение их энергетических ресурсов. Фактически часть потенциальной биомассы культуры переводится в форму синтезируемого белка, и чем эффективнее происходит эта конверсия, тем выше доля целевого белка и, соответственно, коэффициент полезного действия процесса. Однако с учетом существенной разницы в уровне и динамике накопления исследуемых рекомбинантных белков в клетках замедление скорости роста культуры продуцента белка капсида не может быть обусловлено только лишь нехваткой питательных веществ. Очевидно, растворимый чужеродный белок оказывает заметный ингибирующий эффект на клетки штамма, но механизм этого воздействия пока неизвестен. Это делает затруднительным увеличение накопления белка капсида в клетках, по крайней мере в растворимой форме. Вполне вероятно, по этой причине часть ресурсов среды может оставаться неиспользованной, альтернативный способ увеличения количества нарабатываемого белка – повышение концентрации клеток продуцента в культуре.

Особенностью автоиндукционных сред является точно сбалансированный состав всех необходимых бактериальным клеткам факторов роста, который позволяет добиться максимально высокого титра клеток и, соответственно, продукции белка, в условиях периодической культуры в небольших объемах. Однако, как уже упоминалось, в таких средах сложно отслеживать процесс накопления рекомбинантных белков. Эта задача существенно упрощается, если культивирование проводить в биореакторе, который позволяет контролировать ряд параметров среды, таких как относительная концентрация кислорода, изменение pH и температуры. Несколько вариантов автоиндукционной среды были проанализированы таким методом, результат типичного эксперимента приведен на рис. 3. Из полученных результатов можно сделать следующие выводы. Кривая роста биомассы продуцента имеет два экспоненциальных периода (рис. 3, б), каждый из которых обозначен своей специфической скоростью роста – первый осуществляется во время потребления глюкозы, которая является приоритетным источником энергии и углерода ($\mu \sim 1,3 \text{ ч}^{-1}$), второй наступает после истощения глюкозы и перехода к использованию глицерина ($\mu \sim 0,7 \text{ ч}^{-1}$) и сопровождается небольшой паузой (около 30 мин), которая выражается в кратковременном, но заметном уменьшении скорости роста.

Момент автоиндукции сопровождается понижением скорости роста культуры до 0,4–0,5 ч^{-1} из-за описанного выше негативного влияния рекомбинантного белка капсида на клетки продуцента и наступает после утилизации глюкозы (указан стрелкой на рис. 3, б), но до полного истощения глицерина, который в меньшей степени ингибирует лактозную индукцию. Повышение концентрации глицерина в среде с 0,5 до 2 % отдалает момент автоиндукции и удлиняет фазу продукции белка, позволяя вырастить культуру до ОП₆₀₀ ~ 31 –33. Однако это приводит к повышению скорости подкисления питательной среды во время роста культуры. Использование дополнительного органического буферного агента типа сукцината натрия (в концентрации 25 мМ), который одновременно является источником энергии и углерода, позволяет поддерживать приемлемый диапазон pH (6,5–7,2) весь период роста культуры и еще больше повысить титр клеток в культуре до ОП₆₀₀ ~ 35 –37.

Лактоза, являясь естественным индуктором используемой системы экспрессии, обеспечивает эффективное накопление рекомбинантного белка капсида в клетках продуцента, а на поздних стадиях, в результате расщепления клеточной β -галактозидазой до глюкозы и галактозы, становится единствен-



ным источником энергии для роста культуры и продукции белка. Однако в отличие от накапливаемых в коблах культур ферментер позволяет выращивать клетки при более высоком относительном содержании кислорода в среде, это приводит к тому, что клетки вырастают до большей плотности ($OP_{600} \sim 15-16$) по сравнению с накапливаемыми культурами ($OP_{600} \sim 10-11$), но продуцируют меньше белка (5–6 %). Эта проблема решается повышением концентрации лактозы в среде с 0,2 до 1 %. При наработке рекомбинантных белков в условиях биореактора для повышения выхода целевого продукта часто применяют стратегии одновременного использования лактозы и ее аналога ИПТГ. Однако добавление ИПТГ после запуска экспрессии не приводило к каким-либо детектируемым изменениям в количестве накапливаемого белка, более того, на поздних стадиях, когда единственным утилизируемым источником энергии становилась лактоза, происходила полная остановка роста, обусловленная, по-видимому, конкурентным ингибированием β -галактозидазы со стороны ИПТГ.

Продуманный и оптимальный баланс питательных веществ в автоиндукционных средах, по-видимому, позволяет повысить, хоть и незначительно, уровень экспрессии рекомбинантного белка капсида по сравнению с простыми средами типа LB (доля рекомбинантного белка в среднем возрастает на 2–3 %). Однако эта разница близка к погрешности измерения и достоверные выводы сделать не позволяет.

Таким образом, было проведено исследование процесса биосинтеза рекомбинантного укороченного белка капсида ЦВС-2 в клетках штамма *E. coli*, результаты которого станут основой для масштабирования его производства.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Finsterbusch T., Mankertz A. Porcine circoviruses – small but powerful // *Virus Res.* 2009. Vol. 143, № 2. P. 177–183.
2. Opriessnig T., Meng X.-J., Halbur P. G. Porcine Circovirus Type 2-Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies // *J. Vet. Diagnostic Investig.* 2007. Vol. 19, № 6. P. 591–615.
3. Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W., Koch M. A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA // *Nature.* 1982. Vol. 295 (5844). P. 64–66.
4. Weingartl H. Porcine circovirus structure and replication: a minireview // *Agric.* 2002. Vol. 14. P. 11–14.
5. Gillespie J., Opriessnig T., Meng X. J., Pelzer K., Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease // *J. Vet. Intern. Med.* 2009. Vol. 23, № 6. P. 1151–1163.
6. Ramamoorthy S., Meng X.-J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox // *Anim. Health Res. Rev.* 2009. Vol. 10, № 1. P. 1–20.
7. Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R., Jestin A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience // *Transbound Emerg. Dis.* 2008. Vol. 55, № 7. P. 273–283.
8. Beach N. M., Meng X.-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2) // *Virus Res.* 2012. Vol. 164 (1/2).
9. Прокулевич В. А., Кудин К. В. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli* // *Микробные биотехнологии.* 2013. Т. 5. С. 131–141.

10. Прокулевич В. А., Потапович М. И. Ветеринарные препараты на основе интерферона // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2011. № 3. С. 51–55.
11. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. Boston, 2003.
12. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.
13. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.

Поступила в редакцию 21.04.2014.

Кирилл Валерьевич Кудин – аспирант, младший научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.